



## Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species

著者	中山 健
内容記述	この博士論文は内容の要約のみの公開（または一部非公開）になっています
year	2017
その他のタイトル	テルピネン4オールは活性酸素種により大腸癌の増殖を抑制する
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8269号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00147974">http://hdl.handle.net/2241/00147974</a>

## 論 文 概 要 (Thesis Abstract)

### ○ 論 文 題 目

Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species

(テルピネン 4 オールは活性酸素種により大腸癌の増殖を抑制する)

### ○ 指 導 教 員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 大河内信弘教授

(所 属) 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名) 中山 健

目的：

Terpinen-4-ol (TP4O)は、*Melaleuca alternifolia* から抽出される植物精油の主成分である。近年、TP4O の抗腫瘍効果に関する報告がみられ、そのメカニズムとしてアポトーシスの関与が挙げられているが、まだ明らかになっていない点も多い。本研究では、TP4O の大腸癌細胞株に対する抗腫瘍効果とその機序を *in vitro* および *in vivo* で検討する。

対象と方法：

i) *in vitro* の検討 ヒト大腸癌細胞株 HCT116 および RKO に TP4O を添加した。WST-8 で殺細胞効果を、Brd-U で増殖抑制効果をそれぞれ検討した。殺細胞効果のメカニズムを検討するため、caspase-3/7 活性、Annexin-V および LDH の測定を行った。TP4O 添加による活性酸素種 (ROS) の発生を電子スピン共鳴により検出し、dihydroethidium (DHE) の測定により定量的評価を行った。ミトコンドリア由来の ROS を共焦点レーザ顕微鏡で観察した。Western blot で ROS 代謝酵素である SOD2 および GPX1 のタンパク質発現量を評価した。ROS が細胞死に及ぼす影響を確認するため、抗酸化物質存在下での細胞生存率を測定した。

ii) *in vivo* の検討 Icr-scid マウスの大腿部皮下に HCT116 を 200 万個移植し、生食投与群 (n = 6), TP4O 投与群 (n = 6) の 2 群を設定した。薬剤の皮下局所投与を 3 日毎に計 5 回行ない、day14 に犠牲死させた。経時的な腫瘍体積を比較して増殖抑制効果を検討し、有害事象評価のため、体重、血清 ALT、血清クレアチニンを測定した。day14 に採取した皮下腫瘍は、抗 8-OHdG 抗体および抗 cleaved caspase-3 抗体を用いて免疫組織染色を行い、酸化ストレスおよびアポトーシスの評価を行った。

結果：

i) *in vitro* の検討 TP4O の添加により HCT116 および RKO の両方で有意に殺細胞効果と増殖抑制効果が認められた ( $p < 0.01$ )。Caspase-3/7 活性および Annexin-V 陽性細胞が TP4O 濃度に比例して増加傾向を示し、LDH の放出は見られなかった。電子スピン共鳴では TP4O 添加によるヒドロキシラジカルの発生が検出され、フローサイトメトリーでは DHE 陽性細胞の増加がみられた。共焦点レーザ顕微鏡でミトコンドリアの分布に一致する ROS の産生が観察された。Western blot では TP4O 添加に伴う SOD2 および GPX1 の発現低下はみられなかった。TP4O 添加による細胞生存率低下は、抗酸化物質の存在下では抑制された。

ii) *in vivo* の検討 TP4O 投与群は生食群に比べ有意に腫瘍増殖を抑制した ( $p < 0.01$ ). 両群間の体重変化, 血清 ALT, 血清クレアチニンに有意差はみられなかった. 免疫組織染色では, 抗 8-OHdG 抗体および抗 cleaved caspase 抗体ともに生食群にくらべ TP4O 群の抗体陽性面積の割合が有意に高かった ( $p < 0.01$ ).

#### 考察:

既報では TP4O の抗腫瘍効果として, ヒト悪性黒色腫細胞株, ヒト非小細胞肺癌株およびヒト白血病細胞株に対するアポトーシスの誘導や, マウス中皮腫細胞株, マウス悪性黒色腫細胞株に対するネクロシスの誘導および細胞周期を停止させることが報告されている. 今回の研究では, *in vitro* で caspase-3/7 活性および Annexin-V 陽性細胞が TP4O 濃度に比例した増加傾向を示し, LDH の放出は見られなかった. *in vivo* においても cleaved caspase 陽性細胞の増加がみられたことから, 抗腫瘍効果の主たる機序としてアポトーシスを生じていることが考えられた.

電子スピン共鳴を用いたヒドロキシラジカルの検出とフローサイトメトリーでの DHE 陽性細胞の増加から, TP4O 添加により細胞内 ROS が増加したと考えられ, 共焦点レーザー顕微鏡の観察結果から, その産生源はミトコンドリアであると考えられた. 細胞内 ROS の増減は, その産生および代謝のバランスにより変動するが, TP4O 添加により ROS の代謝酵素である SOD2 および GPX1 は減弱しておらず, TP4O 添加による ROS の増加は, 代謝系の抑制ではなく, ROS 産生そのものの増加によることが示唆された. また, TP4O による殺細胞効果は, 抗酸化剤添加により抑制されたことから, TP4O による抗腫瘍効果の主要因として ROS の産生が考えられた.

癌細胞は, その増殖能を維持するため代謝が亢進しており, 正常細胞に比較して ROS の産生およびその代謝系が活性化している. そのため, 癌細胞は正常細胞に比べ, より過剰な ROS が生じた際の予備力が少ないと言われており, その性質に着目した癌治療の可能性が報告されている. 本研究でも, TP4O は正常細胞への明らかな有害事象を生じることなく抗腫瘍効果を示しており, 大腸癌治療へ応用できる可能性が示された.

#### 結論:

TP4O は, 大腸癌細胞株の ROS 産生を増大させることによりアポトーシスを誘導し, 新たな抗癌治療法となりうる可能性が示された.